

## T-2588 のマウス、ラット、イヌでの急性毒性試験

佐藤 盛・中川重仁・柴田哲夫・河村泰仁  
永井章夫・霜鳥智也・吉田一晴・米田豊昭

富山化学工業株式会社総合研究所

T-2588 の急性毒性試験をマウス、ラットおよびイヌを使用して行ない次の結果を得た。

1) 経口投与での LD<sub>50</sub> 値はマウス、ラットとも 6g/kg 以上であり、イヌでは 2g/kg 以上であった。イヌで投与後経時的に測定した血液学的検査、血液化学検査結果には T-2588 投与による変化は認められなかった。

2) 皮下投与での LD<sub>50</sub> 値はマウス、ラットとも 6g/kg 以上であった。投与 2 週後の剖検では注射部位皮下に被験検体の残存とその周囲の肉芽組織が観察された。ラットでは盲腸腔が拡張していた。

3) 腹腔内投与での LD<sub>50</sub> 値はマウスの雄で 6g/kg 以上、雌で 5.86g/kg、ラットの雄で 5.63g/kg、雌で 5.09g/kg であった。投与 2 週後の剖検では腹腔内臓器の炎症性癒着が観察された。

T-2588 は Fig. 1 に示す化学構造と化学名を有する新しいエステル型経口セフェム系抗生物質で、水に溶けにくく、エーテルにわずかに可溶、メタノール、アセトン、酢酸エチル、塩化メチレンに可溶な苦味を有する白色ないし淡黄色の結晶性粉末である。T-2588 の急性毒性試験をマウス、ラットおよびイヌを用いて行なったので結果を報告する。本試験に使用したロットは No. 580207 と 580223 であった。試験は 1983 年 2 月～6 月に実施した。

## I. 実験材料および方法

## 1. 使用動物と飼育条件

マウス：4 週齢で購入した Jcl-ICR 系マウス（日本クレア）196 匹（雄 98、雌 98）を 2 週間予備飼育し、6 週齢（体重、雄 24～38g、雌 20～31g）で実験に使用した。マウスは実験動物用床敷（日本クレア）を敷いたプラスチック製ケージに 7 匹ずつ収容し、個体識別は耳パンチと色素塗布およびケージラベルで行なった。

ラット：4 週齢で購入した Jcl-SD 系ラット（日本クレア）160 匹（雄 80、雌 80）を 2 週間予備飼育し、6 週齢（体重、雄 162～215g、雌 131～178g）で実験に使用した。金属製ケージに 5～7 匹ずつ収容し、個体識別はマウスと同様の方法で行なった。

マウス、ラットとも室温 23±2℃、湿度 50～60%、6:00～18:00 人工照明に設定した飼育環境（マウスとラットは別の飼育室に収容）で、固型飼料（日本クレア、CE-2）と水（紫外線殺菌）を自由に与えて飼育した。

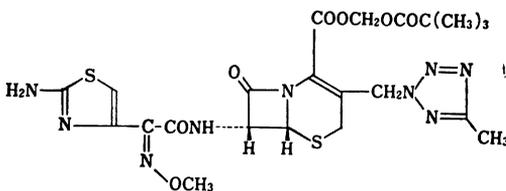
イヌ：14～15 カ月齢で（株）富士アニマルファームから購入したビーグル犬雄 2 頭を、約 3 カ月間の予備飼育期間を置いた後、実験に使用した。投与時の体重は 10.3 kg および 10.7 kg であった。イヌは金属製個別ケージに収容し、耳介入墨とケージラベルで個体識別を行ない、室温 22±2℃、湿度 30～70%、6:00～18:00 人工照明に設定した飼育室で固型飼料（日本クレア、CD-5）1 日 200g と水を自由に与えて飼育した。

## 2. 投与量の決定と投与方法

マウス、ラット：マウス、ラットとも経口投与（胃管による強制経口投与）、皮下投与（背部皮下注射）および腹腔内投与で急性毒性を検討した。

T-2588、6g/kg を予備的に投与したところ、マウスでは皮下投与と腹腔内投与で死亡例がみられ、ラットでは腹腔内投与で死亡例がみられたが、経口投与とラットの皮下投与では死亡例がなかった。これらの結果から、各試験系とも最高用量を 6g/kg として 2～8 段階の用量群を設定し、1 群に雌雄各 5～7 匹の動物を配分した。T-2588 は 0.5% carboxymethylcellulose (CMC) 溶液で

Fig. 1 Chemical structure of T-2588



pivaloyloxymethyl (+)-(6R, 7R)-7-[(Z)-2-(2-amino-4-thiazolyl)-2-methoxyiminoacetamido]-3-[(5-methyl-2H-tetrazol-2-yl)methyl]-8-oxo-5-thia-1-azabicyclo[4.2.0]oct-2-ene-2-carboxylate

は高濃度の懸濁が困難であったため、0.5% CMC 溶液にさらに hydroxypropylcellulose (HPC-L, 日曹, Lot. AE-261) を 0.1% 添加した水溶液に T-2588 を 10% 懸濁したものを投与液とした。HPC-L は製剤的に結合剤として常用されており、マウス、ラットに対しては非代謝性で、毒性はほとんどないことが知られている<sup>1,4)</sup>。マウス、ラットとも経口投与試験では投与前に一夜絶食した。

イヌ：カプセルによる強制経口投与で急性毒性を検討した。ゼラチンカプセル (日本エランコ, No.000) に T-2588 を充填して投与する場合に 1 回で投与できる最大量である 2g/kg (イヌ 1 頭当り 28~29 カプセル) を投与量とし、一夜絶食した 2 頭のイヌに経口投与した。

### 3. 検査

マウス、ラット：投与後、症状の観察と体重測定を 2 週間の観察期間中毎日行なった。死亡動物はすみやかに剖検し、死因の解明につとめた。2 週間の観察期間終了後、生存例を全例解剖し肉眼的観察を行なったほか、一部の動物については肝、腎、心、肺、脾などの主要臓器と肉眼的異常部位を 10% ホルマリン固定、H・E 染色して組織学的検査を行なった。LD<sub>50</sub> 値は 2 週後の死亡率から probit 法により算出した。

イヌ：投与後、症状の観察を毎日、体重の測定を 2 日ごとに行ない、2 週間の観察期間中に以下の検査を実施した。

#### 1) 血液学的検査 (投与前, 1, 2, 6, 10, 14 日後)

赤血球数 (コールターカウンター ZBI 型)

白血球数 (コールターカウンター ZBI 型)

ヘマトクリット値 (毛細管遠心法)

ヘモグロビン濃度 (シアンメトヘモグロビン法)

網赤血球数 (ブリリアントクレシブルブルー, 超生体染色)

血小板数 (Brecher-Cronkite 法)

#### 2) 血液化学検査 (投与前, 1, 2, 4, 6, 24 時間, 2 日後, 以後 2 日ごと)

GOT (Karmen 法, オートセラ<sup>®</sup> GOT, 第一化学)

GPT (Karmen 法, オートセラ<sup>®</sup> GPT, 第一化学)

アルカリホスファターゼ, ALP (Bessey-Lowry 法, オートセラ<sup>®</sup> ALP, 第一化学)

乳酸脱水素酵素, LDH (Wróblewski-LaDue 法, オートセラ<sup>®</sup> LDH, 第一化学)

コリンエステラーゼ, Ch-E (柴田, 高橋法, オートセラ<sup>®</sup> CHE, 第一化学)

総コレステロール (酵素法, オートセラ<sup>®</sup> CHO, 第一化学)

総ビリルビン (Michaëlsson 法, オートセラ<sup>®</sup> BIL,

### 第一化学)

尿素窒素, UN (Urease-Indophenol 法, オートセラ<sup>®</sup> UN, 第一化学)

クレアチニン (Jaffe 法, オートセラ<sup>®</sup> CRE, 第一化学)

血糖 (Glucose Oxidase 法, オートセラ<sup>®</sup> GLU, 第一化学)

総蛋白 (Biuret 法, オートセラ<sup>®</sup> TP, 第一化学)

以上日立 705 形自動分析装置で測定した。

### 3) 剖検

観察期間終了後、ペントバルビタール麻酔下で放血致死させ解剖した。肉眼的観察の後脳、下垂体、顎下腺、甲状腺、胸腺、心、肺、肝、腎、脾、膵、副腎、精巣、前立腺、胃、小腸、大腸、腸間膜リンパ節、大腿骨骨髓を摘出し、10% ホルマリン固定、H・E 染色を施して組織学的検査を行なった。

## II. 実験結果

### 1. LD<sub>50</sub> 値と死亡経過

LD<sub>50</sub> 値を Table 1 に、マウス、ラット試験での死亡経過を Table 2 に示す。T-2588 の経口投与での LD<sub>50</sub> 値はマウス、ラットとも 6 g/kg 以上であり、イヌでも 2 g/kg の経口投与で死亡例がなかったことから LD<sub>50</sub> 値は 2 g/kg 以上であった。皮下投与での LD<sub>50</sub> 値は、マウス、ラットとも 6 g/kg 以上であった。腹腔内投与での LD<sub>50</sub> 値はマウスの雄で 6 g/kg 以上、雌で 5.86 g/kg、ラットの雄で 5.63 g/kg、雌で 5.09 g/kg であった。マウス、ラットの腹腔内投与での死亡例は、ほとんどの例が投与翌日から 2 日後に死亡していた。マウスの経口投与群で 1~2 例の死亡例がみられたが、後述するよういづれも誤投与が原因の死亡であった。

### 2. 症状と死亡例の剖検所見

#### 1) マウス

Table 1 LD<sub>50</sub> of T-2588 in mouse, rat and dog

Species	Route	LD <sub>50</sub> (g/kg)	
		Male	Female
Mouse	P.O.	>6.00	>6.00
	S.C.	>6.00	>6.00
	I.P.	>6.00	5.86(7.18-5.53)
Rat	P.O.	>6.00	>6.00
	S.C.	>6.00	>6.00
	I.P.	5.63(7.77-4.94)	5.09(5.44-4.76)
Dog	P.O.	>2.00	

( ): 95% Confidence limits  
Calculated by probit method



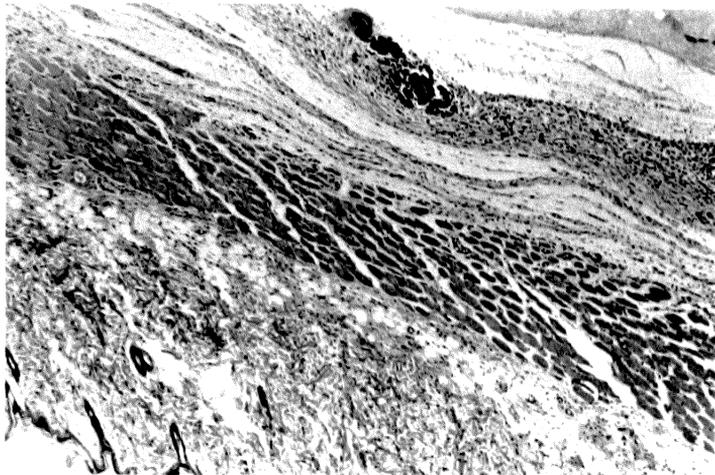


Photo.1 Subcutaneous tissue of injection site from a female rat given subcutaneously T-2588 at 4 g/kg. Edema, cell infiltration and granulation tissue are seen.  $\times 52$  H. E. staining.

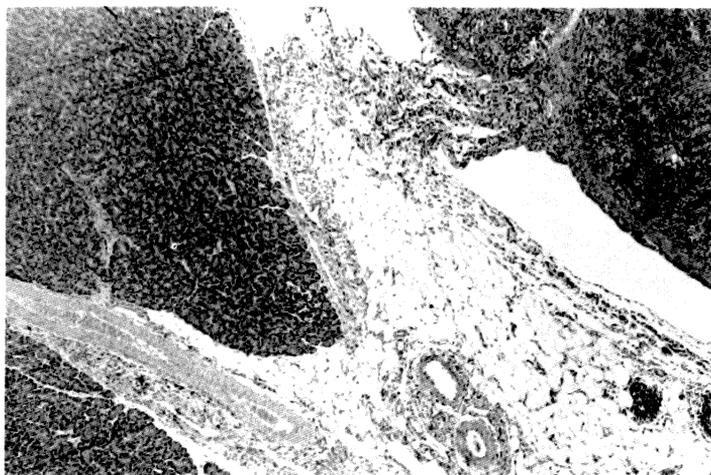


Photo.2 Abdominal organs from a male rat given intraperitoneally T-2588 at 4.54 g/kg. Adhesion of spleen and pancreas is seen.  $\times 52$  H. E. staining.

Table 3 Body weight changes in beagle dogs given a single oral administration of T-2588

Dose	Time (day) Dog No.	0	1	3	5	7	9	11	13	14
		T-2588 2g/kg	1	10.7	10.7	10.6	10.4	10.5	10.7	10.2
	2	10.3	10.2	10.1	9.7	10.0	10.1	9.9	9.8	10.2

Body weight : kg

を通じて触診できた。各用量群とも死亡例はなかった。

腹腔内投与では、各用量群のほぼ全例が注射後の軽い一過性の writhing を示した後、自発運動が減少した。さらに 4.54 g/kg 以上の用量群では立毛や呼吸数の減少が投与 6 時間後頃から出現した。これらの症状はしだいに軽減し、3 日後の観察ではほとんど消失していた。生

存例の投与翌日の体重は軽度減少を示したが以後順調な伸びを示した。軽度軟便が投与翌日から 9 日後頃まで観察された。死亡例は投与後 2 日以内に死亡した。剖検時肉眼的観察では腹腔内臓器の漿膜に多量の被験検体と思われる物質が付着していたほか多量の腹水の貯留が認められた。また、肺と胸腺が暗赤色を呈していた。

### 3) イヌ

T-2588, 2 g/kg を経口投与した 2 頭のイヌの体重を Table 3 に示す。2 週間の観察期間を通じて異常症状は認められなかったが、投与後 5 時間半から翌朝にかけて排泄された糞中に被験検体と思われる物質が混入していた。観察期間中体重の著しい減少はみられず、死亡例はなかった。

### 3. マウス, ラット生存例の剖検所見と組織学的検査

#### 1) マウス

Table 4 Hematological findings in beagle dogs given a single oral administration of T-2588

Dose	Dog No.	Time (day)	Item					
			0	1	2	6	10	14
T-2588 2 g/kg	1	RBC ( $\times 10^4/\text{mm}^3$ )	803	733	714	704	756	748
		WBC ( $\times 10^2/\text{mm}^3$ )	78	87	76	76	92	63
		Hematocrit (%)	53	51	51	50	50	48
		Hemoglobin (g/dl)	20.3	19.2	19.0	18.9	18.7	18.4
		Reticulocyte (‰)	4	4	4	2	0	0
		Platelet ( $\times 10^3/\text{mm}^3$ )	328	275	279	301	292	259
	2	RBC ( $\times 10^4/\text{mm}^3$ )	767	631	715	589	636	617
		WBC ( $\times 10^2/\text{mm}^3$ )	73	66	58	57	61	54
		Hematocrit (%)	53	43	45	41	42	39
		Hemoglobin (g/dl)	17.6	16.2	16.2	15.1	15.1	14.9
		Reticulocyte (‰)	8	6	6	4	6	6
		Platelet ( $\times 10^3/\text{mm}^3$ )	294	243	255	265	272	267

経口投与2週間後の剖検では特に T-2588 投与に起因すると思われる異常所見はなかったが、4 g/kg 投与群の1例に、誤投与にもかかわらず死に至らなかったことが原因と思われる胸腔内あるいは腹腔内臓器の癒着が観察された。組織学的には癒着部位に異物性肉芽組織が認められた。また、6 g/kg 投与群の1例に恥骨結合部皮下の嚢胞が観察された。これは組織学的には尿道球腺炎の像を呈しており、T-2588 投与とは無関係に出現した偶発所見であった。

皮下投与2週間後の剖検所見としては、約半数のマウスの注射部位皮下に被験検体と思われる物質を容れた米粒大の結節をみた以外異常がみられなかった。組織学的検査でも、皮下注射部位に浮腫と細胞浸潤を伴った肉芽組織を見た以外異常を認めなかった。

腹腔内投与2週間後の剖検時肉眼的観察では、ほぼ全例に腹腔内諸臓器の癒着や癒着による肝の変形、腹膜の白濁がみられたが、死亡例でみられたような被験検体様物質の付着や腹水の貯留などの所見はなかった。組織学的検査では腹腔内臓器(肝、胃、脾、横隔膜など)に炎症性癒着が認められた。

## 2) ラット

経口投与2週後の剖検では、1例に誤投与によると思われる肺の異物性肉芽組織をみた以外、肉眼的、組織学的異常は認められなかった。

皮下投与2週間後の剖検では、ほぼ全例の盲腸腔が拡張していたほか、注射部位皮下に大豆大～そらまめ大で、中に被験検体様物質と淡褐色の液体を容れた嚢胞が観察された。組織学的にはこの嚢胞は、かなり線維化の進んだ肉芽嚢(Photo. 1)であった。他には特記すべき異常は認められなかった。

腹腔内投与2週間後の剖検では、各用量群のほぼ全例に腹腔内臓器の癒着、腹膜の白濁、腹水貯留が観察されたほか、癒着の程度が比較的強い各用量群の2~3例では精巣の萎縮や白膜と陰囊の癒着がみられた。盲腸腔拡張は観察されなかった。組織学的検査では腹腔内臓器の周囲炎と癒着(Photo. 2)がみられたほか、一部の萎縮した精巣では精子形成低下と白膜の細胞浸潤、肥厚などの変化が認められた。これら検体の局所刺激作用によると思われる炎症性の変化以外には特記すべき異常は認められなかった。

Table 5 Serum biochemical findings in beagle dogs given a single oral administration of T-2588

Dose	Dog No.	Time Item	Time (hour)					Time (day)							
			0	1	2	4	6	1	2	4	6	8	10	12	14
T-2588 2 g/kg	1	GOT (U/l)	23	28	26	25	31	25	25	24	25	22	18	21	22
		GPT (U/l)	25	26	25	23	25	28	25	28	25	24	22	22	24
		ALP (U/l)	14.2	13.5	13.2	13.2	15.1	13.8	14.2	15.5	15.6	14.6	13.6	13.6	13.6
		LDH (U/l)	124	80	102	108	113	140	71	99	66	67	52	74	83
		Ch. E ( $\Delta$ pH)	0.54	0.50	0.48	0.47	0.52	0.51	0.46	0.55	0.53	0.51	0.48	0.46	0.49
		Chol. (mg/dl)	124	121	116	114	126	121	111	128	127	118	111	118	124
		UN (mg/dl)	13.6	15.5	16.0	14.2	13.7	20.0	18.7	14.2	14.0	18.6	17.3	18.2	16.5
		Creatinine (mg/dl)	0.9	0.9	0.9	0.9	0.7	0.9	0.8	0.8	0.8	0.9	0.9	0.9	0.9
		Bilirubin (mg/dl)	0.2	0.2	0.2	0.2	0.3	0.4	0.2	0.3	0.2	0.2	0.2	0.2	0.3
		Glucose (mg/dl)	86	98	95	85	89	82	85	88	88	94	101	94	91
		Total protein (g/dl)	6.0	5.9	5.8	5.7	6.2	6.0	5.6	5.9	5.9	5.7	5.4	5.7	5.8
T-2588 2 g/kg	2	GOT (U/l)	27	27	31	34	44	28	24	25	27	22	19	19	22
		GPT (U/l)	30	29	27	29	32	33	32	32	31	30	26	26	42
		ALP (U/l)	10.5	9.2	9.4	9.4	9.9	10.6	10.2	10.1	9.5	9.5	8.7	8.8	8.9
		LDH (U/l)	50	99	89	102	114	78	58	75	80	81	51	45	57
		Ch. E ( $\Delta$ pH)	0.48	0.43	0.44	0.42	0.44	0.45	0.42	0.49	0.46	0.44	0.44	0.41	0.41
		Chol. (mg/dl)	118	104	105	101	105	102	99	108	102	106	96	103	104
		UN (mg/dl)	19.3	22.2	21.4	19.6	19.1	19.4	22.5	16.2	13.8	16.6	16.7	19.1	18.0
		Creatinine (mg/dl)	0.9	0.8	0.7	0.7	0.8	0.8	0.8	0.7	0.7	0.8	0.8	0.7	0.7
		Bilirubin (mg/dl)	0.2	0.3	0.3	0.2	0.3	0.3	0.3	0.2	0.3	0.3	0.2	0.2	0.2
		Glucose (mg/dl)	94	90	92	85	88	88	83	84	86	88	87	90	85
		Total protein (g/dl)	6.2	5.8	5.7	5.7	6.1	6.0	5.9	5.7	5.7	5.9	5.4	5.7	5.7

#### 4. イヌ臨床検査値の変化, 剖検所見および組織学的検査

血液学的検査値の経時変化を Table 4 に, 血液化学検査値の変化を Table 5 に示す。血液学的検査では, 観察期間中生理的範囲内での若干の測定値の変動はみられるものの T-2588 投与に起因すると思われる異常値は認められなかった。血液化学検査では 1 例の GOT 値が投与 6 時間後検査で, GPT が投与 14 日後の検査で, 投与前の値より若干高い数値を示したが明らかな異常値と言える変動ではなかった。他の臨床検査項目にも異常はみられなかった。投与 2 週後の剖検時肉眼的観察では異常がみられず, また, 組織学的検査結果にも異常は認められなかった。

### III. 総括と考察

新しいエステル型経口セフェム系抗生物質である T-2588 の急性毒性試験をマウス, ラットおよびビーグル犬を使用して行なった。

マウス, ラットに対する LD<sub>50</sub> 値は, 経口投与, 皮下投与とも 6 g/kg 以上であった。経口投与では, 投与後軽度の立毛と自発運動減少がみられたほか, ラットでは軽度軟便が 1 週間ほど観察されたが, 他には特記すべき症状はなく, 2 週後の剖検結果にも異常は認められな

かった。皮下投与では, 投与後自発運動の減少がみられ, ラットでは軽度軟便が約 1 週間観察された。2 週後の剖検では, 注射部位皮下に未吸収の被験検体と, その局所刺激作用によると思われる肉芽組織がマウス, ラットともに認められた。さらに, ラットでは盲腸腔の拡張が観察された。これは, 投与局所から 2 週間にわたって持続的に吸収された検体が, 抗生剤一般にみられるようなラットの盲腸の変化<sup>3-5)</sup>を引き起こしたものと思われた。

腹腔内投与での LD<sub>50</sub> 値は, マウスの雄で 6 g/kg 以上, 雌で 5.86 g/kg, ラットの雄で 5.63 g/kg, 雌で 5.09 g/kg であり, 種差や性差は明瞭ではなかった。注射後 writhing, 立毛, 自発運動減少, 呼吸数減少などの症状がマウス, ラットともに発現し, 死亡例は 2 日以内に死亡した。死亡例の腹腔内には未吸収の被験検体と腹水の貯留が観察された。生存例の 2 週後の剖検では, マウス, ラットとも腹腔内臓器の炎症性癒着が著しかったが未吸収の検体は観察されなかった。精巣が陰囊と癒着していたラットの一部に精子低形成がみられた。腹腔内投与死亡例の死因はいずれも検体の局所刺激作用による腹膜炎であり, 2 週後剖検例の形態変化も検体の局所刺激性に起因するものであった。一部のラットにのみ見られた精子低形成は白膜の炎症に起因する二次的な変化と

思われるが、今後の毒性試験で注意を払う必要があろうと思われた。

T-2588 のイヌでの急性毒性試験では、1回で投与可能な最大量である 2 g/kg を経口投与しても死亡例はなく、LD<sub>50</sub> 値は 2 g/kg 以上であった。投与後の症状、血液学的検査、血液化学検査結果の経時的推移に異常はみられず、2週後の剖検所見、組織学的検査結果にも異常は認められなかった。

以上のように T-2588 はマウス、ラット、イヌに対しては毒性の少ない化合物であった。

#### 文 献

- 1) KITAGAWA, H.; H. YANO, H. SAITO & Y. FUKUDA: Acute, subacute and chronic toxicities of hydroxypropylcellulose of low-substitution in rats. 応用薬理 12 (1): 41~66,

1976

- 2) 関谷 淳, 山本順之祐, 前川 寛, 酒井 清, 杉本明子, 宮川英一, 小林庸次, 中島光好, 前田清: Hydroxypropyl Methylcellulose の急性および亜急性毒性試験。応用薬理 8 (5): 547~554, 1974
- 3) SAVAGE, D. C. & R. DUBOS: Alterations in the cecum and its flora produced by antibacterial drugs. J. Exptl. Med. 128: 97~110, 1968
- 4) 長谷川隆司, 三好幸二, 清水康賢, 野村 章, 仲澤政雄, 原田喜男: Cefaclor の急性、亜急性ならびに慢性毒性試験。Chemotherapy 27 (S-7): 765~811, 1979
- 5) 森本宏一, 清水 充, 田所 規, 高橋昌三, 宮地徹: Cefroxadine (CGP-9000) の毒性試験, 第3報, 慢性毒性試験。Chemotherapy 28 (S-3): 116~130, 1980

## ACUTE TOXICITY STUDY OF T-2588 IN MICE, RATS AND BEAGLE DOGS

SHIGERU SATO, SHIGEHITO NAKAGAWA, TETSUO SHIBATA,  
YASUHIITO KAWAMURA, AKIO NAGAI, TOMOYA SHIMOTORI,  
KAZUHARU YOSHIDA and TOYOAKI YONEDA  
Research Laboratory, Toyama Chemical Co., Ltd.

Acute toxicity study of T-2588 was carried out in mice, rats and beagle dogs, and the following results were obtained.

1) In the oral administration, LD<sub>50</sub> values were more than 6 g/kg in mice and rats, and more than 2 g/kg in beagle dogs.

No hematological and serum biochemical changes were observed in beagle dogs.

2) In the subcutaneous administration, LD<sub>50</sub> values were more than 6 g/kg in mice and rats. At necropsy, administered test articles were remained in the injected site of mice and rats, and granulation tissue were found in the injected area of mice and rats. Enlargement of cecum lumen was observed in rats.

3) In the intraperitoneal administration, LD<sub>50</sub> values were more than 6 g/kg in male and 5.86 g/kg in female mice, and 5.63 g/kg in male and 5.09 g/kg in female rats.

At necropsy, inflammatory adhesion of abdominal organs were observed in mice and rats.